

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月31日

出願番号
Application Number: 特願2003-093900

[ST. 10/C]: [JP 2003-093900]

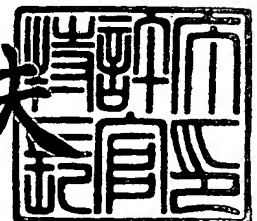
願人
Applicant(s): 日本油脂株式会社
学校法人東京理科大学

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2004年 5月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-170

【提出日】 平成15年 3月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市富士崎 1-8-21 栗山ハイツ I-20
2

【氏名】 小倉 敦彦

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 2-17-14 TTサンシティB
棟 104号

【氏名】 姜 義哲

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中野区上鷺宮 5-17-22

【氏名】 片岡 一則

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県守谷市けやき台 3-5-17

【氏名】 長崎 幸夫

【特許出願人】

【識別番号】 000004341

【氏名又は名称】 日本油脂株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501105015

【氏名又は名称】 財団法人科学技術振興会

【代理人】

【識別番号】 100081514

【弁理士】

【氏名又は名称】 酒井 一

【選任した代理人】

【識別番号】 100082692

【弁理士】

【氏名又は名称】 蔵合 正博

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007010

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0204965

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリエチレングリコール修飾半導体微粒子、その製造法及び生物学的診断用材料

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも片末端にチオール基を有する、数平均分子量300～20000のポリエチレングリコールが、カドミウムを介して、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶に結合してなる水溶性のポリエチレングリコール修飾半導体微粒子。

【請求項2】 II-VI族半導体微結晶のコアが、CdS、CdSe、CdTe、ZnSe又はZnTeである請求項1記載の半導体微粒子。

【請求項3】 前記ポリエチレングリコールが、片末端がチオール基、他端がアルデヒド基、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する、ヘテロ二官能ポリエチレングリコールである請求項1又は2記載の半導体微粒子。

【請求項4】 前記ヘテロ二官能ポリエチレングリコールの官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる請求項3記載の半導体微粒子。

【請求項5】 少なくとも片末端にチオール基を有する数平均分子量300～20000のポリエチレングリコールと、カドミウム塩と、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶とを反応させることを特徴とする請求項1記載の半導体微粒子の製造法。

【請求項6】 前記ポリエチレングリコールとカドミウム塩とを反応させた後、前記半導体微結晶を反応させることを特徴とする請求項5記載の製造法。

【請求項7】 ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶の表面にカドミウムを付加させ、表面にカドミウムを有する半導体微結晶を得た後、少なくとも片末端にチオール基を有する数平均分子量300～20000のポリエチレングリコールを反応させることを特徴とする請求項1記載の半導体微粒子の製造法。

【請求項8】 請求項4記載の半導体微粒子を有することを特徴とする生物学的診断用材料。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、ポリエチレングリコール(以下、PEGと略す)によって修飾された、水溶性のナノメータサイズの半導体微粒子、その製造法及び該粒子を有する生物学的診断用材料に関する。

【0002】**【従来の技術】**

II-VI族の半導体微結晶(半導体ナノ結晶)は、配位性溶媒であるトリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成されることが報告されている(例えば、特許文献1参照)。該半導体微結晶は、バルクの半導体とは異なる光学特性を有することが知られている。例えば、半導体微結晶は、そのサイズを制御することにより様々な波長の光や色に発色し、また、吸収帯が広く、単一波長の励起光により発光させることができる。更に、その蛍光スペクトルは、幅が狭く良好な対称形を示す。更にまた、半導体微結晶は、有機色素に比べて耐久性、耐退色性に優れる等の特徴を有する。従って、半導体微結晶は、表示素子、記憶材料等の光学、電子分野への応用のみならず、蛍光マーカー、生物学的診断用途への応用研究が近年盛んに行われている。

【0003】

半導体微結晶である量子ドットは、それ自身水に不溶性であるため、生物学的診断用途に用いる場合、結晶表面を改質／修飾することにより水中に安定分散させる必要がある。これまでに、量子ドットの水溶化方法としては、メルカプトエタノールやチオグリセロールを、またメルカプトウンデカン酸やリポ酸等の低分子チオール化合物を半導体微結晶の表面に結合させることにより水溶化させる方法が報告されている(例えば、非特許文献1、特許文献2参照)。

しかし、これらの水溶化剤は、生物学的診断法において、非特異的吸着が十分抑制できず、微量の目的物質のみを高感度で検出する際に問題が生じる。

また、オクチルアミンを部分修飾したポリアクリル酸を用いてZnSシェルを有するCdSe半導体微結晶を水中に分散させる報告がなされている(例えば、非特許

文献2参照)。しかし、この方法は、半導体微結晶の水溶化に3段階の工程を要するために、非常に煩雑である。

更に、生物学的診断用材料として、連結剤を介して親和性分子を結合させた半導体微結晶の概念が示された文献も開示されている(例えば、特許文献3参照)。しかし、該文献には、連結剤に関して非特異的吸着の抑制に関する配慮がなされておらず、しかも実施例においては半導体微結晶の製造が示されるのみで、親和性分子を結合させた例は示されていない。

更にまた、生物学的診断用材料等として、片末端にチオール基を有するポリアルキレングリコールを、ZnSシェルを有するCdSe等の半導体微結晶に結合させ、該半導体微結晶を水溶化させる技術も提案されている(例えば、特許文献4参照)。しかし、該文献に記載された実施例には、ポリアルキレングリコールとして短鎖のトリアルキレングリコールの誘導体を用いた例が示されるに過ぎず、長鎖のポリアルキレングリコールを用いた例は示されていない。このようなトリアルキレングリコール誘導体を結合させた半導体微結晶を、例えば、生物学的診断用材料に使用する場合は、特定の物質に対して特異的親和性を有する有機分子を安定に結合させることができず、また非特異的吸着抑制効果が十分でなく、更には生理条件下において半導体微結晶を安定に分散させることができないという問題が生じる。

更にまた、上記短鎖のトリアルキレングリコール誘導体等の低分子チオール化合物を半導体微結晶の水溶化に用いた場合には、有機溶媒中に比べて蛍光強度が著しく低下するという問題が生じることも知られている(例えば、非特許文献3参照)。

【0004】

【特許文献1】

米国特許第6207229号明細書

【特許文献2】

米国特許第6319426号明細書

【特許文献3】

米国特許第5990479号明細書

【特許文献4】

特開2002-121549号公報

【非特許文献1】

Jornal of Physical Chemistry B, 103, 3065 (1999)

【非特許文献2】

Nature Biotechnology, オンラインバージョン2 (2002)

【非特許文献3】

Journal of Colloids and Surfaces, 202, 145 (2002)

【0 0 0 5】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、特異的認識能を有する生体分子の結合が容易なPEG修飾半導体微粒子を提供することにある。

本発明の別の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、しかも生物学的診断に適したPEG修飾半導体微粒子及び該微粒子を用いた生物学的診断用材料を提供することにある。

本発明の他の目的は、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができる半導体微粒子を、簡便に製造することができるPEG修飾半導体微粒子の製造法を提供することにある。

【0 0 0 6】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した、まず、特定のII-VI族半導体微粒子を水溶化すると共に、例えば、生理条件下においても有機溶媒中に比して顕著な蛍光強度の低下が抑制できる半導体微結晶の水溶化剤について検討した。その結果、特定分子量範囲の片末端がチオール基であるPEGが有用であることに注目した。しかし、このようなPEGは、上記特許文献4に記載の方法を用いても、例えば、ZnSシェルを有するCdSe半導体結晶等に十分結合させることができなかった。そこで、更に検討した結果、カドミウムを介することにより、特定分子量範囲の片末端がチオール基であるPEGを、ZnSシェルを有するCdSe半導体

結晶等に容易に結合させることができること、更には、該PEGの他端に特定の官能基を設けることにより、生物学的診断用材料への応用が容易になることを見出し本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明によれば、少なくとも片末端にチオール基を有する、数平均分子量300～20000のPEGが、カドミウムを介して、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルの有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶に結合してなる水溶性のPEG修飾半導体微粒子が提供される。

また本発明によれば、前記PEGが、片末端がチオール基、他端がアルデヒド基、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する、ヘテロ二官能PEGである前記半導体微粒子が提供される。

更に本発明によれば、前記ヘテロ二官能PEGの官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる前記半導体微粒子が提供される。

更にまた本発明によれば、少なくとも片末端にチオール基を有する数平均分子量300～20000のPEG水溶液と、カドミウム塩水溶液と、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルの有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶の溶液とを反応させることを特徴とする前記半導体微粒子の製造法が提供される。

また本発明によれば、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルの有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶の表面にカドミウムを付加させ、表面にカドミウムを有する半導体微結晶の溶液を得た後、少なくとも片末端にチオール基を有する数平均分子量300～20000のPEG水溶液を反応させることを特徴とする前記半導体微粒子の製造法が提供される。

更に本発明によれば、ヘテロ二官能PEGの官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合してなる前記半導体微粒子を有することを特徴とする生物学的診断用材料が提供される。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明につき更に詳細に説明する。

本発明のPEG修飾半導体微粒子(以下本発明の粒子ということがある)は、少な

くとも片末端にチオール基を有する特定分子量のPEGが、カドミウムを介して、特定の半導体微結晶に結合した水溶性の半導体微粒子であり、量子ドット等として機能する。

ここで、水溶性とは、本発明の粒子を水に分散させた場合、目視的に濁りのない透明な溶液を与える状態を示すことを意味する。

【0009】

本発明の粒子を構成する特定の半導体微結晶は、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルを有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶である。該半導体結晶のコアは、シェルを形成する半導体化合物と異なり、且つ本発明の所望の目的が達成できるII-VI族半導体化合物であれば特に限定されない。好ましくは、CdS、CdSe、CdTe、ZnS又はZnTe等が挙げられる。本発明の粒子を生物学的診断用材料に用いる場合に特に好ましい半導体微結晶のシェルとコアの組合せとしては、粒径分布が狭いものが好ましく、例えば、コアがCdS又はCdSeであり、シェルがZnSである半導体微結晶が好ましい。このような粒径分布の狭いII-VI族半導体微結晶は、配位性溶媒であるトリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成されることが知られている(米国特許第6207229号明細書)。

【0010】

前記半導体微結晶の粒径は、通常1~10nm、量子効果による吸発光波長の制御の点で2~8nmが好ましい。また、前記半導体微結晶の粒度分布は、特に限定されないが、生物学的診断用材料に用いる場合には、通常、標準偏差として±20%以内、特に±10%以内が好ましい。

【0011】

本発明の粒子を構成する特定分子量のPEGは、少なくとも片末端がチオール基である、数平均分子量が300~20000、好ましくは500~10000、特に好ましくは1000~7000のPEGである。数平均分子量が300未満では、得られる量子ドットの非特異的吸着抑制能が十分でなく、20000を超えるとPEG自身の排除体積の問題により、前記半導体結晶表面へ十分結合させることができないので好ましくない。

前記特定分子量のPEGは、単一の数平均分子量からなるものに限定される必要はない。即ち、好ましい2種以上の数平均分子量の混合物であっても良い。

【0012】

前記特定分子量のPEGは、少なくとも片末端にチオール基を有していれば良いが、例えば、生物学的診断用材料に用いる場合には、片末端がチオール基、他端がアルデヒド基、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基からなる群より選択される官能基(A)を有する、即ち、両末端に異なる官能基を有するヘテロ二官能PEGであることが好ましい。

前記ヘテロ二官能PEGは、例えば、式 $\text{XR}^1-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^2\text{SH}$ で表される。ここで、式中 R^1 は、炭素数が0～7の炭化水素基を示し、 R^2 は炭素数1～7の炭化水素基を示し、Xはアルデヒド基、水酸基、アミノ基又はカルボキシル基を示す。またnは、5～450の整数である。

本発明の粒子を構成するPEGとして、前記式で示されるヘテロ二官能性PEGを用いることにより、タンパク等の非特異的吸着を抑制する機能が付与でき、ドラッグデリバリーシステムや生理活性物質の分野でも有効に用いることが可能になり、生物学的診断の際に問題となるバックグラウンドやノイズを効果的に低減することができる。

【0013】

前記ヘテロ二官能性PEGは、例えば、3,3-ジエトキシ-1-プロパノールを開始剤とし、エチレンオキシドを重合させて α -アセタール- ω -ヒドロキシルPEGを得、得られたPEGのヒドロキシル基を官能基変換する方法等により得ることができる(Bioconjugate Chemistry, 11(6) 947(2000))。

このような方法においては、例えば、通常のPEGと同様に、開始剤／エチレンオキシドの量的関係を制御することにより任意の分子量のヘテロ二官能性PEGを容易に合成でき、また通常のPEGと同様に、単分散なヘテロ二官能性PEGが得られる他、 α 及び ω 末端の官能基をほぼ定量的に導入したヘテロ二官能性PEGも容易に得ることができる。

【0014】

例えば、ヘテロ二官能性PEGとして α -アルデヒド- ω -ヒドロキシルPEGは、 α -アセタール- ω -ヒドロキシルPEGの末端水酸基を、メタンスルホンクロリドによりメシル化した後、O-エチルジチオ炭酸カリウムによりジチオカーボネート

化、更にアルキルアミンにより還元チオール化し、更に酸処理することにより得られる。また、 α -ヒドロキシ- ω -チオールPEG、 α -カルボキシル- ω -チオールPEG、 α -アミノ- ω -チオールPEGは、それぞれ、 α -アルデヒド- ω -チオールPEGを還元、酸化、アンモニア処理した後、還元アミノ化することにより得られる。

【0015】

本発明の粒子は、前記半導体微結晶と、前記ヘテロ二官能性PEG等の特定分子量のPEGが、カドミウムを介して結合した半導体微粒子であるが、該カドミウムは、前記PEGが有するチオール基と、前記半導体微結晶のシェル表面と結合する。本発明の粒子はこのような構造を採ることにより、蛍光強度を保持した状態で、水中に安定分散(溶解)させることができる。

【0016】

本発明の粒子は、例えば、生物学的診断用材料とする場合には、前記ヘテロ二官能PEGの官能基(A)に、特異的認識能を有する生体分子が結合したものであっても良い。このような生体高分子は、前記官能基(A)が以下に示す結合を容易に形成するので容易に導入することができる。即ち、前記官能基(A)がアルデヒド基の場合は、1級アミノ基と容易に反応し、シッフ塩基が形成され、また、該シッフ塩基は、水素化ホウ素ナトリウム等により温和な条件により還元され、リガンドと更に安定な結合を形成する。前記官能基(A)が水酸基である場合は、脱水縮合剤存在下、カルボキシル基と容易に反応し、エステル結合を形成する。前記官能基(A)がカルボキシル基である場合は、脱水縮合剤存在下、水酸基と容易に反応し、エステル結合を形成する。前記官能基(A)がアミノ基である場合は、脱水縮合剤存在下、カルボキシル基と容易に反応し、アミド結合を形成する。

【0017】

前記特異的認識能を有する生体分子としては、一般に知られた分子生物学的な特異的認識能を有し、1級アミノ基、カルボキシル基あるいは水酸基を有する生体分子であればいかなる生体分子であっても良い。例えば、デオキシリボ核酸、糖、抗体に代表される蛋白質等の生体分子が好ましく挙げられる。

このような生体分子を有する本発明の粒子は、結合された生体分子の種類に応じて、例えば、遺伝子チップや蛍光イムノアッセイ等に用いる生物学的診断用材

料とすることができる。

【0018】

本発明の粒子を調製するには、例えば、前記特定の分子量を有するPEGと、カドミウム塩と、前記半導体微結晶とを反応させる製造法(以下、第1の方法という)、若しくは、前記半導体微結晶の表面にカドミウムを付加させ、表面にカドミウムを有する半導体微結晶を得た後、前記特定の分子量を有するPEGを反応させる方法(以下、第2の方法という)等により得ることができる。

前記第1及び第2の方法に用いる特定の分子量を有するPEG及び前記半導体微結晶としては、それぞれ前述した具体例のものを好ましく用いることができる。

前記第1及び第2の方法に用いるカドミウム塩は、カドミウムを含む水溶性の塩であれば特に限定されず、例えば、塩化カドミウム、酢酸カドミウム、炭酸カドミウム、蟻酸カドミウム、硝酸カドミウム、硫酸カドミウム、過塩素酸カドミウム等が挙げられる。該カドミウム塩の使用量は、反応させる対象に応じて適宜選択して決定することができる。

【0019】

前記第1の方法において、前記特定の分子量を有するPEG、カドミウム塩及び前記半導体微結晶との反応は、前記特定の分子量を有するPEGとカドミウム塩とを反応させた後、前記半導体微結晶を反応させることが好ましいが、これらを同一の反応系内に同時に投入して反応させても同様な反応を得ることができる。

前記第1の方法としては、例えば、前記特定の分子量を有するPEGと、トリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシド中において合成して得られたアルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシドで修飾された前記半導体微結晶とを、水又は緩衝溶液と有機溶媒との混合系中でカドミウム塩の存在下に配位子交換反応させる方法等が挙げられる。

反応は、通常、不活性ガス雰囲気下、4～60℃で0.5～3時間の条件で行うことができる。

【0020】

一方、前記第2の方法としては、例えば、前記アルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシドで修飾された半導体微結晶の表面にカドミウムを付加さ

せ、表面にカドミウムを有する半導体微結晶を得た後、前記特定の分子量を有するPEGを、水又は緩衝溶液と有機溶媒との混合系中で配位子交換反応させる方法等が挙げられる。

前記表面にカドミウムを有する半導体微結晶を得る反応は、例えば、不活性ガス雰囲気下、60～300℃、1分間～1時間反応させる方法等により行うことができるが、この際、例えば、硫黄含有溶液を滴下して半導体結晶表面にカドミウムをCdSとして付加することもできる。

前記カドミウムを有する半導体微結晶と、前記特定の分子量を有するPEGとの配位子交換反応は、例えば、不活性ガス雰囲気下、4～60℃で0.5～3時間の条件で行うことができる。

【0021】

前記第1及び第2の方法において、配位子交換に用る有機溶媒としては、前記特定のPEG及び前記トリアルキルフォスフィン／トリアルキルフォスフィンオキシドにより修飾された半導体微結晶の両者が可溶な溶媒であれば特に限定されず、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸ジイソプロピル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルアセトアミド等が好ましく挙げられる。

該有機溶媒は、通常、前記半導体微結晶濃度が $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ～ $20\text{mg}/\text{ml}$ 程度になる割合で用いられる。

【0022】

前記第1及び第2の方法において、前記特定の分子量を有するPEGの使用量は、通常、前記半導体微結晶構成元素に対して0.1モル当量以上の過剰量使用するので、反応終了後、最終的に生ずる、未反応の特定の分子量を有するPEGを除去する必要がある。該除去は、例えば、遠心分離により得られる本発明の粒子を沈積させる方法、あるいは透析操作又はカラムにより特定分子量を有するPEGを除去する方法等により行うことができる。

【0023】

前記第1又は第2の方法において、配位子交換反応させた後に本発明の粒子を得るには、例えば、配位子交換反応後の反応液に、非極性有機溶媒を添加し、有機

相及び水相に二相分離することで、水相に溶解状態の本発明の粒子を得ることができる。このような本発明の粒子は、用途に応じてそのまま使用することができる他、抽出精製、乾燥等により粉末粒子として得ることもできる。

前記非極性有機溶媒とは、主に炭化水素系の有機溶媒であり、例えば、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等が挙げられる。

【0024】

【実施例】

以下実施例により本発明を更に詳細に説明するが本発明はこれらに限定されない。

製造例1 ZnSシェルを有するCdSe半導体微結晶(CdSe-ZnS半導体微結晶)の溶液の調製

半導体微結晶の合成は、Qu等;J. Amer. Chem. Soc., 129(4)2049(2002)に記載の方法に準じて以下に示す合成方法により行った。

(セレン溶液の調製)

セレン319.6mgをナス型フラスコに秤とり、アルゴン雰囲気下、トリブチルフォスフィン1.186ml(以下TBPと略す)及びジオクチルアミン8.51ml(以下DOAと略す)をシリンジ操作により加えた。セレンが完全に溶解し、無色透明の溶液が得られるまで室温で攪拌を行った。得られたセレン溶液は、使用する直前まで冷蔵保存した。

(CdSe微結晶の溶液の調製)

冷却管、温度計及び3方コックを装着した3ッ口フラスコをアルゴン置換し、酸化カドミウム(CdO)50.8mg及びステアリン酸456mgを導入し、150℃に加熱することによりCdOを完全に溶解させた。反応容器を室温付近まで冷却した後、トリオクチルフォスフィンオキシド7.76g(以下TOPOと略す)及びヘキサデシルアミン7.76g(以下HDAと略す)を加え、300℃まで昇温することにより無色透明の溶液を得た。続いて、前記セレン溶液1ml(Cd/Se=1/1)をシリンジ操作により一度に加えて反応を開始した。反応開始より7分後に反応を停止し少量の反応溶液を採取し、UV照射し蛍光体を得られたことによりCdSe微結晶が得られていることを確認した。従って、得られた反応液は、CdSe微結晶の溶液であることが判った。

【0025】

(Zn/S含有溶液の調製)

ナス型フラスコをアルゴンガスによって置換し、ジエチル亜鉛1Mヘプタン溶液 1ml (1mmol)、ビストリメチルシリルスルフィド $267\mu\text{l}$ (1.257mmol) 及び TBP 7.5ml をシリンジ操作により導入し反応させて Zn/S 含有溶液を得た。この溶液は使用直前まで冷蔵保存した。

(CdSe-ZnS半導体微結晶の溶液の調製)

冷却管、温度計及び3方コックを装着した3ッ口フラスコをアルゴン雰囲気にした後、前記で調製した CdSe 微結晶の溶液 2.5ml を導入し、 220°C に加熱した。次に、前記 Zn/S 含有溶液 1.4ml ($\text{Cd/Zn}=1/4$) を 1滴/5秒の速度でゆっくり滴下した。滴下終了後、浴温度を 100°C まで冷却し、更に1時間攪拌を続けた。反応終了後、反応混合物を適量 (2~10倍容量) のクロロホルムに溶解させた後、僅かに不溶物が精製するまでメタノールを加えた。遠心操作により不溶物を沈積させた後、デカンテーションにより上澄みを除去し、CdSe-ZnS微結晶の沈積物を得た。得られた沈積物に、該沈積物中の CdSe 含量が $10\mu\text{mol/ml}$ となるようにクロロホルムを加え溶解させ、CdSe-ZnS微結晶の溶液を得た。

【0026】

製造例2 ZnSシェル表面にCdSを付加したCdSe半導体微結晶 (CdSe-ZnS-CdS半導体微結晶) の溶液の調製

(S含有溶液の調製)

ナス型フラスコをアルゴンガスによって置換した後、ビストリメチルシリルスルフィド $267\mu\text{l}$ (1.257mmol) 及び TBP 8.5ml をシリンジ操作により導入し、S含有溶液を得た。この溶液は使用直前まで冷蔵保存した。

(CdSe-ZnS-CdS半導体微結晶の合成)

冷却管、温度計及び3方コックを装着した3ッ口フラスコをアルゴン雰囲気とし、製造例1で調製した CdSe-ZnS 半導体微結晶の溶液 2.5ml を加え、クロロホルムを留去した後に、TOP 0.1g 及び ステアリン酸カドミウム 7.8mg を導入し 220°C に加熱した。更に、前記 S 含有溶液 $175\mu\text{l}$ ($\text{CdSe/CdS}=1/0.5$ となる量) を 1滴/5秒の速度でゆっくりと滴下した。滴下終了後、浴温度を 100°C まで冷却した後、更に1時

間攪拌を続けた。反応終了後、反応混合物を適量(2~10倍容量)のクロロホルムに溶解させた後、僅かに不溶物が生成するまでメタノールを加えた。遠心操作により不溶物を沈積させた後、デカンテーションにより上澄みを除去し、CdSe-ZnS-CdS半導体微結晶である沈積物を得た。得られた沈積物に、沈積物中のCdSe含量が $10\mu\text{mol/ml}$ となるようにクロロホルムを加え、CdSe-ZnS-CdS半導体微結晶の溶液を調製した。

【0027】

製造例3 α -アセタール- ω -チオール-PEG(ヘテロ二官能性PEG)の合成

α -アセタール- ω -チオール-PEGの合成は、秋山等;Bioconj.Chem, 11(6)947 2000)に記載の方法に従って以下に示すとおり合成した。

3,3-ジエトキシ-1-プロパノールにカリウムナフタレン処理を行った後、エチレンオキシドの重合を行った。得られた α -アセタール- ω -OH-PEGの末端水酸基をメタンスルホニル化、O-エチルジチオカーボネート化及び還元反応を経て α -アセタール- ω -チオール-PEGを合成した。 α -アセタール- ω -チオール-PEGの分子量は、開始剤とエチレンオキシドの量的関係を操作することにより調整し、数平均分子量5000及び2000の2種類のヘテロ二官能性PEGを得た。得られた各ヘテロ二官能性PEGは、 $^1\text{H-NMR}$ 及びGPCを用いて分析した結果、末端官能基が定量的に導入された所定分子量の α -アセタール- ω -チオール-PEGであることを確認した。

【0028】

実施例1 PEG修飾CdSe-ZnS半導体粒子の調製

製造例1で調製したCdSe-ZnS半導体微結晶の溶液 $100\mu\text{l}$ に、製造例3で調製した数平均分子量5000のヘテロ二官能性PEG 50mg及び CdCl_2 1.65mgを溶解させたリン酸緩衝液1mlを加え、斜光下、室温において激しく攪拌した。30分後、n-ヘキサン10ml及びリン酸緩衝液9mlを加え、更に5分間激しく攪拌を行った。静置、分液させた後にUV(254nm)を照射したところ、下層(水相)のみに蛍光が認められた。

一方、 CdCl_2 を添加しなかった場合は上層(有機相)のみに蛍光が認められた。従って、カドミウム塩を反応させることにより、ヘテロ二官能性PEGがCdSe-ZnS半導体結晶表面に結合し、該半導体結晶を水溶化することが明らかとなった。

更に、上下層を分液した後に蛍光スペクトルを測定した結果、水相の蛍光スペ

クトルは、水溶化前のピーク位置、半値幅及び蛍光強度を保持していることが確認された。

【 0 0 2 9 】

実施例2 PEG修飾CdSe-ZnS-CdS半導体粒子の調製

製造例2で調製したCdSe-ZnS-CdS半導体微結晶の溶液100 μ lに、リン酸緩衝液1 ml及び製造例3で調製した数平均分子量2000のヘテロ二官能性PEG 20mgを加え、斜光下、室温において激しく攪拌した。30分後、n-ヘキサン10ml及びリン酸緩衝液9mlを加え、更に5分間激しく攪拌を行った。30分後、n-ヘキサン10ml及びリン酸緩衝液9mlを加え、更に5分間激しく攪拌を行った。静置、分液させた後にUV(254nm)を照射したところ、下層(水相)のみに蛍光が認められた。

次いで、得られた溶液を超遠心操作(230000g \times 20分)し、沈積物を沈積させた。上澄みを分離後、リン酸緩衝液を加え、同様の操作を更に2回繰り返した。得られたPEG修飾CdSe-ZnS-CdS半導体粒子を凍結乾燥後、 $^1\text{H-NMR}$ (D_2O 、積算64回)を測定することにより、配位子交換状況を確認した。この結果、PEG由来のプロトンのみが観測され、アルキルフォスフィン／アルキルフォスフィンオキシド及びヘキサデシルアミンに由来するメチルプロトンは、全く観測されなかった。

【 0 0 3 0 】

上記調製したPEG修飾CdSe-ZnS-CdS半導体粒子の溶液を石英セルにとり、分光光度計により37 $^{\circ}\text{C}$ における透過光の経時変化を180時間測定した(透過光波長700nm)。この結果、透過率の変化は全く認められず、生理条件下においてPEG修飾CdSe-ZnS-CdS半導体粒子が凝集及び析出することなく安定に分散していた。また、経時変化測定後のサンプルにUV(254nm)を照射したところ、サンプルが均質に発色していることが確認された。

【 0 0 3 1 】

実施例3 ビオチン-PEG修飾量子ドットの調製

製造例3で調製した数平均分子量5000のヘテロ二官能性PEGを水溶液とした後、1N及び0.1N塩酸を滴下してpH=2.1とした。室温において2時間攪拌した後に、1N及び0.1N水酸化ナトリウムを加えpH=8とした。この溶液を、透析操作により脱塩し、凍結乾燥することにより α -アルデヒド- ω -チオール-PEGをえた。 α -アル

デヒド- ω -チオール-PEGを水溶液とした後に同モル量のビオチンヒドラジドを加え、室温にて攪拌した。2時間後にNaBH₄を加え、更に1時間攪拌した。この溶液を上述と同様に透析／凍結乾燥を行った。その結果、得られた化合物が α -ビオチン- ω -チオール-PEGであることを¹H-NMR及びGPCにより確認した。

次に、製造例3で調製した数平均分子量2000のヘテロ二官能性PEGの代わりに、上記で得られた α -ビオチン- ω -チオール-PEGを用いた以外は、実施例2と同様に行い、 α -ビオチン- ω -チオール-PEG修飾CdSe-ZnS-CdS半導体粒子であるビオチン-PEG修飾量子ドット(生物学的診断材料)を調製した。

一方、生物学的診断用材料の比較のため、 α -メトキシ- ω -チオール-PEGを用いて、同様な方法により、 α -メトキシ- ω -チオール-PEG修飾量子ドットを調製した。

得られたビオチン-PEG修飾量子ドット及び α -メトキシ- ω -チオール-PEG修飾量子ドットをそれぞれPBS溶液に溶解した後、市販のテキサスレッドラベル化アビジンを添加し、室温にて攪拌した。1時間後、蛍光スペクトルを測定し(励起波長400nm)、テキサスレッドに由来する蛍光スペクトルの積分値(ピーク面積)を算出した。このような方法によって、 α -ビオチン- ω -チオール-PEG修飾量子ドット又は α -メトキシ- ω -チオール-PEG修飾量子ドットと、テキサスレッド化アビジンとの量的関係を変化させて、量子ドットからテキサスレッドへのエネルギー移動について測定を行った。結果を図1に示す。

図1より、ビオチン-アビジンの特異的相互作用により量子ドットとテキサスレッドの距離が短くなり、効率的にエネルギー移動が起こることが判った。

【 0 0 3 2 】

【発明の効果】

本発明のPEG修飾半導体微粒子は、特定分子量のPEGが半導体微結晶の表面に結合しているので、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、該特定分子量のPEGが特異的認識能を有する生体分子を有する場合には、特に、生物学的診断用材料として有用である。

本発明の製造法では、カドミウムを介して特定分子量のPEGと特定の半導体微結晶を反応させるので、蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させ

ることができる半導体微粒子を簡便に製造することができる。

【図面の簡単な説明】

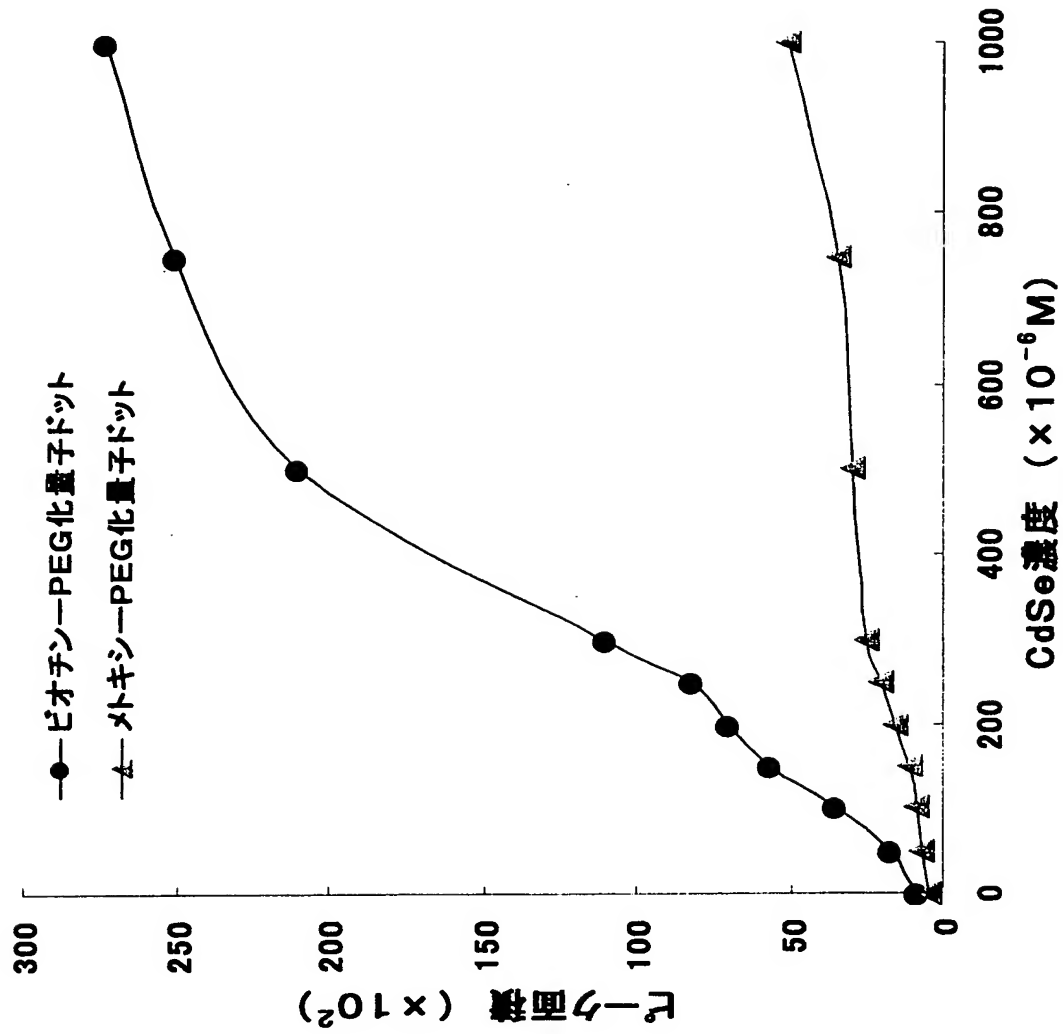
【図1】

実施例3において測定した量子ドットからテキサスレッドへのエネルギー移動現象の測定結果を示すグラフである。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 蛍光強度の低下が有効に抑制され、水中に安定分散させることができ、また、特異的認識能を有する生体分子の結合が容易なPEG修飾半導体微粒子、その簡便な製造法及び生物学的診断用材料を提供すること。

【解決手段】 本発明の水溶性のPEG修飾半導体微粒子は、少なくとも片末端にチオール基を有する、数平均分子量300～20000のPEGが、カドミウムを介して、ZnO、ZnS、ZnSe又はZnTeシェルの有するコアシェル構造のII-VI族半導体微結晶に結合した構造を有し、本発明の生物学的診断用材料は、前記微粒子のPEGがヘテロ二官能性PEGである半導体微粒子を含む。

【選択図】 なし



【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 Y150926-1
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003- 93900
【承継人】
【識別番号】 000125370
【住所又は居所】 東京都新宿区神楽坂 1 丁目 3 番地
【氏名又は名称】 学校法人東京理科大学
【代表者】 塚本 桓世
【承継人代理人】
【識別番号】 100094547
【弁理士】
【氏名又は名称】 岩根 正敏
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 033570
【納付金額】 4,200円



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-093900
受付番号	50301598631
書類名	出願人名義変更届
担当官	小池 光憲 6999
作成日	平成15年11月11日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 9月29日

【承継人】

【識別番号】 000125370

【住所又は居所】 東京都新宿区神楽坂1-3

【氏名又は名称】 学校法人東京理科大学

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100094547

【住所又は居所】 東京都千代田区神田淡路町1丁目1番地 田村ビル6階岩根特許事務所

【氏名又は名称】 岩根 正敏



特願 2 0 0 3 - 0 9 3 9 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 3 4 1]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 1 1 月 9 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号

氏 名

日本油脂株式会社

特願 2 0 0 3 - 0 9 3 9 0 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 1 0 5 0 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 3 月 1 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田 4 - 1 7 - 2 5

氏 名

財団法人科学技術振興会

特願 2003-093900

出願人履歴情報

識別番号

[000125370]

1. 変更年月日

2001年 2月20日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都新宿区神楽坂1-3

氏 名

学校法人東京理科大学